Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 13, No. 1, Apr. May. 2017, p. 167- 179

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۳، شماره ۱، فروردین-اردیبهشت ۱۳۹۶ ص.۱۷۹-۱۶۷

استخراج عصاره خام از برگ گیاه پنیرک (*Malva neglecta*) و بررسی توانایی جذب رادیکال آزاد آن

حسین جوینده[1]*، وحید سماواتی[2]

تاریخ دریافت:۱۳۹۴/۰۳/۲۵
تاریخ پذیرش:۱۳۹۴/۰۸/۲۳

چکیده

در این تحقیق، تأثیر عوامل زمان، دما و نسبت حلال به ماده خشک در میزان عصاره خام استخراجی از برگ گیاه پنیرک گونه *Malva neglecta* مورد مطالعه قرار گرفت. برای این منظور از روش استخراج با آب داغ و زمان استخراج ۱ تا ۸ ساعت، دمای ۵۰ تا ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و نسبت حلال به ماده خشک ۳ تا ۳۰ میلی‌لیتر بر گرم استفاده گردید. از روش سطح پاسخ نیز جهت یافتن تأثیر متقابل فاکتورها و برآورد بهترین شرایط فرآیند به کمک طرح (Box-behnken (BBD با سه متغیر در سه سطح و ۵ تکرار در نقطه مرکزی استفاده گردید. همچنین ویژگی جذب رادیکال‌های آزاد DPPH، هیدروکسی و سوپراکسید به کمک آزمون‌های شیمیایی بررسی شد. بهینه‌سازی بازده استخراج به کمک روش سطح پاسخ نشان داد که می‌توان با ترکیبی از زمان استخراج ۶ ساعت، دمای استخراج ۹۰ درجه سانتی‌گراد و نسبت حلال به ماده خشک ۱۹، به بالاترین بازده استخراج عصاره خام (۹/۱۸ درصد) دست یافت. به‌علاوه، نتایج آزمون‌های شیمیایی نشان دادند که عصاره خام استخراجی دارای فعالیت قوی جذب رادیکال‌های آزاد DPPH، هیدروکسیل (OH) و سوپراکسید می‌باشد به‌طوری که توانایی جذب این رادیکال‌های آزاد توسط عصاره خام استخراجی بیشتر از آنتی‌اکسیدان طبیعی اسید آسکوربیک و مصنوعیBHT می‌باشد. براساس یافته‌های این پژوهش، ترکیبات استخراج شده از برگ‌های این گیاه می‌تواند به‌عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدان و جاذب رادیکال آزاد معرفی شود و از آن در صنایع غذایی، دارویی و بهداشتی استفاده گردد.

واژه‌های کلیدی: *Malva neglecta*، استخراج، عصاره خام، ویژگی آنتی‌اکسیدانی، رادیکال آزاد

مقدمه

پنیرک (*Malva*) گیاهی علفی یک ساله، دوساله یا پایا با خواص شناخته شده دارویی است. گونه‌های مختلف پنیرک همانند *M. crispa*، *M. montana*، *M. parviflora*، *M. sylvestris*، *M. rotundiflora* و M. pussila و *M. neglecta* در کشورهای مختلف دنیا کشت می‌گردد یا به‌طور خودرو رشد می‌کند (Azimova وGlushenkova ، ۲۰۱۲). گونه‌ی موجود آن در ایران (*Malva neglecta*) دارای برگ‌هایی دایره‌ای شکل و دندانه‌دار و گل‌هایی بنفش رنگ و کوچک می‌باشد (صالحی سورمقی، ۱۳۸۷). این گیاه هرز در مناطق مختلف ایران همانند مازندران، فارس، لرستان، اصفهان، فارس، کرمان، تهران، سیستان و بلوچستان و خوزستان به‌طور خودرو و حداکثر تا ارتفاع ۴۰ سانتی‌متر می‌روید. مصرف این گیاه برای درمان سرفه، مشکلات تنفسی و سیستم گوارشی تجویز می‌گردد (Baytop، ۱۹۸۴). برگ این گیاه حاوی حدود ۸ درصد موسیلاژ می‌باشد که پس از هیدرولیز، قندهای آرابینوز، گلوکز، رامنوز، گالاکتوز و گالاکتورونیک اسید از آن تولید می‌گردد (صالحی سورمقی، ۱۳۸۷). همچنین برگ آن حاوی مقداری تانن و فلاونوئید به‌همراه قند گلوکز می‌باشد (Güder و Korkmaz، ۲۰۱۲). خواص آنتی‌اکسیدانی گونه‌های مختلف پنیرک در نقاط دیگر دنیا توسط برخی محققین گزارش شده است (Mavi و همکاران، ۲۰۰۴؛ Samavati و Manoochehrizade ، ۲۰۱۳_a).

آنتی‌اکسیدان‌ها، مواد طبیعی یا سنتزی هستند که از اکسیداسیون ترکیبات مواد غذایی جلوگیری می‌کنند و از این طریق قابلیت نگهداری آن‌ها را افزایش می‌دهند. از طرف دیگر، این ترکیبات با خنثی کردن رادیکال‌های آزاد در سیستم‌های بیولوژیکی، مانع از ناهنجاری‌های مختلف بویژه سرطان می‌گردند (Espin و همکاران، ۲۰۰۰). امروزه، همانند سایر ترکیبات مورد استفاده در

---

۱ و ۲- به ترتیب دانشیار و استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان.
(* - نویسنده مسئول: Email: hosjooy@yahoo.com)
DOI: 10.22067/ifstrj.v1395i0.47538

صنعت غذا، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در مقایسه با انواع سنتزی آن مورد توجه بیشتری قرار گرفته است. این درحالیست که به‌دلیل مشخص شدن عوارض نامطلوب آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی BHT و BHA نظیر ایجاد سرطان و آسیب کبدی بر حیوانات آزمایشگاهی(Ebrahimzadeh و همکاران، ۲۰۰۸)، تمایل به استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی و عصاره استخراجی از آنها در جنبه‌های مختلف تحقیقاتی و کاربردی بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. آنتی‌اکسیدان‌ها، بویژه ترکیبات دارای بنیان حلقوی فنولی با گروه‌های OH، با جذب رادیکال آزاد نقش مهمی در پیشگیری از اکسیداسیون ترکیبات مختلف بخصوص چربی‌ها از خود نشان می‌دهند (Fennema، ۱۹۹۶). از طرف دیگر، بسیاری از ترکیبات پلی‌ساکاریدی استخراج شده از گیاهان از چنین ویژگی برخوردارند. تحقیقات نشان داده است که بخش عمده کربوهیدرات‌ها در مواد گیاهی که از انواع پلی‌ساکاریدها می‌باشند مکانیسم ناشناخته‌ای را طی فعالیت آنتی‌اکسیدانی از خود نشان می‌دهند. در آزمایش روی حیوانات معلوم گردیده پلی‌ساکاریدها، بویژه پکتین‌ها که عمدتاً در بافت‌های گیاهی یافت می‌شوند، خاصیت ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی و ضددیابتی از خود نشان می‌دهند و حتی می‌توانند انسولین خون را تنظیم کنند. پکتین‌ها در واقع حاوی نسخه خاصی از اسید دی–گالاکتورونیک موسوم به هوموگالاکتورونان هستند که بیشتر خواص آنتی‌اکسیدانی دارند (طاهری، ۱۳۸۳). به‌علاوه، ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی بالایی در برخی گیاهان و جلبک‌های دریایی گزارش شده است که این خاصیت به وجود اسیدهای فنولیک (به دو شکل آزاد یا متصل شده به پلی‌ساکاریدها) و پلی‌ساکاریدهای سولفاته نسبت داده شده است (Balasundram و همکاران، ۲۰۰۶؛ Qi و همکاران، ۲۰۱۰؛ Costa و همکاران، ۲۰۱۰).

تولید گونه‌های مختلف اکسیژن فعال، بیش از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن باعث ایجاد استرس‌های اکسیداتیو می‌شود. شواهد نشان می‌دهد که استرس از عوامل مهم پیری، اختلال در عملکرد مغز، بیماری‌های کبدی، اختلالات قلبی عروقی، و سرطان می‌باشد (Zha و همکاران، ۲۰۰۹). در بین گونه‌های فعال اکسیژن، رادیکال هیدروکسی، فعال‌ترین رادیکال آزاد می‌باشد که به کلیه مولکول‌های بیولوژیک حمله می‌کند و آنها را وارد چرخه زنجیره‌ای اکسیداسیون می‌کند (Barry و Susanna، ۱۹۹۳). رادیکال آزاد DPPH، رادیکال پایداری بوده که دارای بیشینه جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر می‌باشد. این رادیکال آزاد از جمله منابع معدود رادیکال‌های پایداری می‌باشد که به‌طور گسترده‌ای در بررسی و ارزیابی توانایی آنتی‌اکسیدان‌ها در جذب رادیکال‌های آزاد به‌کار می‌رود (Xie و همکاران، ۲۰۱۰). در سیستم‌های زیستی، آنزیم گزانتین اکسیداز، واکنش اکسیداسیون گزانتین به اسید اوریک را کاتالیز می‌کند. در طی اکسیداسیون گزانتین، O_2^- و H_2O_2 تشکیل می‌شود (Britigan و همکاران، ۱۹۹۰؛Wang; و همکاران، ۲۰۰۹). در نتیجه، این آنزیم به‌عنوان منبع مهمی از آنیون سوپراکسید (O_2^-) در نظر گرفته می‌شود. یون سوپراکسید رادیکالی است که با سرعت بالایی با ترکیب NO واکنش داده و اکسید پروکسی نیتریت ($ONOO^-$) تولید می‌کند (White و همکاران، ۱۹۹۴). در pH فیزیولوژیک، آنیون ($ONOO^-$) و دیگر گونه‌های فعال نیتروژن در بسیاری از انواع بیماری‌ها مانند بیماری‌های قلبی– عروقی شرکت دارند (Pacher و همکاران، ۲۰۰۷).

استخراج ترکیبات عصاره گیاهان به روش‌های مختلفی انجام می‌شود، اما استخراج با آب معمول‌ترین و عمده‌ترین روش سنتی استخراج ترکیبات عصاره خام گیاهی می‌باشد (Khodaei و همکاران، ۲۰۱۶). بررسی و بهینه‌سازی عوامل مؤثر بر میزان استخراج ترکیبات خام عصاره از جنبه اقتصادی و کیفی، مهم و ضروری به‌نظر می‌رسد. به‌طورکلی، بازده استخراج از منابع گیاهی به عوامل مختلفی از جمله زمان استخراج، دمای استخراج، نسبت آب به مواد گیاهی، اندازه ذرات مواد گیاهی و تعداد استخراج‌ها بستگی دارد (Chen و همکاران، ۲۰۱۲).

روش سطح پاسخ (RSM)، به‌دلیل استفاده عملی آن در بهینه‌یابی‌ها، یک استراتژی کارآمد برای بهینه‌سازی یک فرآیند چند متغیره است. به‌کارگیری روش RSM می‌تواند منجر به تسهیل پیچیدگی روش‌های آزمایش مورد نیاز برای ارزیابی متغیرهای چندگانه و برهمکنش میان آنها شود. محققان زیادی این روش را برای بهینه‌سازی شرایط استخراج پلی‌ساکاریدها، ساپونین، ترکیبات فنولی و ... استفاده کرده‌اند. به‌طورکلی، طرح مرکب مرکزی چرخش‌پذیر (CCRD[1])، طرح مرکب مرکزی (CCD[2]) یا طرح باکس بنکن (BBD[3]) برای مناسب‌سازی یک چند جمله‌ای درجه ۲ با حداقل تکنیک مربع، که یک معادله را برای شرح این که چطور متغیرهای آزمون روی پاسخ مورد نظر اثر می‌گذارند، و همچنین تعیین روابط بین متغیرها، پذیرفته شده است (Singh، ۲۰۱۰).

هدف از این تحقیق بررسی عوامل مؤثر در میزان استخراج ترکیبات عصاره خام از برگ گیاه پنیرک، گونه *Malva neglecta* شامل زمان، دما و نسبت حلال به ماده خشک و ارزیابی ویژگی جذب رادیکال‌های آزاد DPPH، هیدروکسی و سوپراکسید توسط عصاره خام استخراجی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

1 Central composite rotatable design
2 Central composite design
3 Box–Behnken Design

مواد

گیاه پنیرک گونه *Malva neglecta* از بازار محلی در اهواز خریداری شد و برگ آن با آب به خوبی شسته شد. سپس با آب مقطر آبکشی شد و در دمای حدود ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت با هوا خشک گردید. پس از خشک کردن، به‌منظور غیرفعال‌سازی آنزیم‌های طبیعی موجود، برگ گیاه در آون در معرض هوای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت قرار گرفت و برگ‌های خشک شده تا زمان استخراج ترکیبات آن در کیسه‌های پلی‌اتیلنی سیاه رنگ در یخچال نگهداری شد. اتانول ۸۰ درصد از شرکت رازی و بافر استات سدیم و استون از شرکت مرک خریداری شدند.

استخراج عصاره خام از برگ گیاه پنیرک

استخراج عصاره خام از برگ گیاه پنیرک به کمک روش Sun و همکاران (۲۰۱۰) انجام گرفت. به‌طور خلاصه، ۲۰۰ گرم برگ خشک شده در یک مخلوط‌کن خرد شد و به پودر نرمی تبدیل شد. سپس جهت حذف مواد رنگی، چربی و الیگوساکاریدها، ۳ بار با اتانول ۸۰٪ با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت مخلوط و شستشو شدند.

برگ‌های خرد شده به کمک سانتریفوژ با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه از مخلوط الکلی جداسازی شد. سپس فرآیند استخراج عصاره خام از ۲۰ گرم نمونه برگ خشک شده با آب داغ در دماهای مختلف (۵۰ تا ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد)، زمان‌های مختلف استخراج (۱ تا ۸ ساعت) و نسبت‌های مختلف وزنی نسبت حلال به ماده خشک (۳ تا ۳۰ میلی‌لیتر بر گرم) انجام گردید. از اتانول ۸۰٪ جهت تکمیل فرآیند استخراج و رسوب‌دهی عصاره خام حاصل استفاده شد. ماده رسوب کرده در آون تحت خلا به کمک هوای گرم با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک و توزین گردید و بازده استحصال عصاره خام استخراجی به کمک رابطه زیر تعیین گردید:

(۱) ۱۰۰× (وزن اولیه پنیرک خشک/ وزن عصاره خام استخراجی)= درصد راندمان استخراج

بررسی خصوصیت جذب رادیکال آزاد عصاره خام استخراج شده

تعیین توانایی جذب رادیکال DPPH

ارزیابی خاصیت جذب رادیکال آزاد عصاره خام استخراج شده از برگ گیاه پنیرک با روش اصلاح شده توسط Tiana و همکاران (۲۰۱۲) انجام گرفت. به‌طور خلاصه، محلول یک گرم بر لیتر عصاره به ۲ میلی‌لیتر محلول ۸۰۰ میلی‌مول DPPH در الکل ۸۰ درصد اضافه شد و حجم مخلوط توسط الکل ۷۰٪ به ۴ میلی‌لیتر رسانده شد. بعد از به‌هم زدن زیاد و شدید، مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه در محل تاریک نگهداری شد. میزان جذب این مخلوط در طول موج ۵۱۷ نانومتر تعیین گردید. مخلوط مشابهی حاوی آنتی‌اکسیدان مصنوعی BHT و بدون عصاره خام استخراجی به‌عنوان نمونه شاهد تهیه گردید. میزان جذب کمتر مخلوط واکنش، نشان‌دهنده فعالیت بیشتر جذب رادیکال‌های آزاد می‌باشد. ظرفیت جذب رادیکال DPPH با استفاده از رابطه زیر تعیین گردید:

(۲) $(A_0 - A_1)/A_0$ = توانایی جذب

A_0: میزان جذب مخلوط بدون عصاره خام استخراجی در طول موج ۵۱۷ نانومتر

A_1: میزان جذب مخلوط حاوی عصاره خام استخراجی در طول موج ۵۱۷ نانومتر

تعیین توانایی جذب رادیکال‌های هیدروکسیل (OH)

توانایی و قابلیت جذب رادیکال‌های هیدروکسیل عصاره خام استخراج شده از برگ گیاه پنیرک به‌کمک روش ارائه شده توسط Sun و همکاران (۲۰۱۰) ارزیابی شد. به‌طور خلاصه، مخلوطی شامل یک میلی‌لیتر محلول ۰/۴۳۵ مولار بریلیانت گرین، یک میلی‌لیتر محلول EDTA و آهن فروس (۹ میلی‌مولار)، یک میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۸/۸ مولار و حجم‌های مختلفی از محلول یک گرم در لیتر عصاره خام استخراجی تهیه گردید. میزان جذب مخلوط بعد از نگهداری مخلوط مذکور در دمای اتاق و در محل تاریک به مدت ۲۰ دقیقه، در طول موج ۶۲۴ نانومتر تعیین گردید. مخلوط مشابهی حاوی اسید آسکوربیک و بدون عصاره‌خام استخراجی به‌عنوان نمونه شاهد تهیه شد. توانایی جذب رادیکال‌های هیدروکسیل توسط عصاره‌خام استخراج شده به‌کمک رابطه زیر تعیین گردید:

(۳) $(A_0 - A_1)/A_0$ = توانایی جذب

A_0: میزان جذب مخلوط بدون عصاره خام استخراجی در طول موج ۶۲۴ نانومتر

A_1: میزان جذب مخلوط حاوی عصاره خام استخراجی در طول موج ۶۲۴ نانومتر

ارزیابی توانایی جذب آنیون‌های سوپراکسید

توانایی جذب رادیکال‌های سوپراکسید با روش اسید پیروگالیک انجام شد (Jiang و همکاران، ۲۰۱۰). به‌طورخلاصه، ابتدا مخلوطی شامل ۲/۵ میلی‌لیتر بافر نمکی فسفات (PBS)، ۲/۵ میلی‌لیتر محلول اسید پیروگالیک ۶ میلی‌مولار، ۴ گرم در لیتر عصاره خام استخراجی و ۰/۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک غلیظ تهیه گردید. مخلوط حاصل در محل تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت نگهداری شد و میزان جذب آن در طول موج ۲۹۹ نانومتر تعیین گردید (A_S). مخلوط حاوی اسید آسکوربیک بدون عصاره خام استخراجی به‌عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شد. آزمایشات در ۳

تکرار انجام شد و نتایج به صورت میانگین تکرارها ارائه گردید. ظرفیت جذب رادیکال‌های سوپراکسید به کمک رابطه زیر تعیین شد:

(۴) ظرفیت جذب رادیکال سوپراکسید $=A_0-(A_S-A_C)/A_0$

A_S، میزان جذب مخلوط بدون عصاره خام استخراجی

A_0: میزان جذب مخلوط حاوی اسید پیروگالیک بدون عصاره خام استخراجی

A_C: میزان جذب مخلوط حاوی عصاره خام استخراجی بدون اسید پیروگالیک

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در این تحقیق از روش سطح پاسخ و طرح باکس بنکن (BBD)، با سه متغیر و در سه سطح برای بررسی بهینه‌سازی فرایند استخراج عصاره خام از برگ گیاه پنیرک به کمک نرم افزار دیزاین اکسپرت نسخه ۸ استفاده شد. زمان استخراج (X_1)، دمای استخراج (X_2) و نسبت حلال به ماده خشک (X_3) برای بهینه‌سازی متغیرهای مستقل استخراج انتخاب شدند. بازده استخراج عصاره خام (Y) به‌عنوان پاسخ آزمایش‌ها در نظر گرفته شد. تعداد ۲۰ آزمایش با توجه به طرح BBD انجام گردید (جدول۱).

جدول۱- متغیرهای مستقل و سطوح مورد استفاده از آنها در طرح سطح پاسخ

	سطوح فاکتورها		
متغیرهای مستقل	+۱	۰	−۱
دمای استخراج (درجه سانتی‌گراد)	۹۵	۷۵	۵۵
زمان استخراج (ساعت)	۶	۳/۵	۱
نسبت حلال به ماده خشک (میلی‌لیتر بر گرم)	۲۱	۱۲	۳

در روش سطح‌پاسخ، رفتار سیستم براساس برازش یک معادله چند جمله‌ای درجه دوم برای مجموعه‌ای از داده‌های تجربی بیان می‌شود.

$$Y = \beta_\circ + \sum_{i=1}^{k}\beta_i X_i + \sum_{i=1}^{k}\beta_{ii} {X_{ii}}^2 + \sum_{1\le i<j}^{k}\beta_{ij}X_iX_j \quad (۵)$$

که در آن Yمتغیر پاسخ، $\beta_\circ$، β_i، β_j، β_{ij} به‌ترتیب ضریب ثابت، ضریب خطی و ضریب درجه دو و ضریب اثر متقابل هستند. X_i و X_j متغیرهای مستقل هستند (Chen و همکاران، ۲۰۱۰). به منظور حصول مدل برای پیش بینی پاسخ (راندمان استخراج) رابطه‌های خطی و چند جمله‌ای درجه دوم بر داده‌های بدست آمده از آزمایش‌ها برازش شدند. سپس این مدل‌ها مورد تجزیه آماری قرار گرفتند تا مدل مناسب گزینش گردد.

نتایج و بحث

تأثیر شرایط فرایند بر بازده استخراج عصاره خام استخراجی از برگ گیاه پنیرک

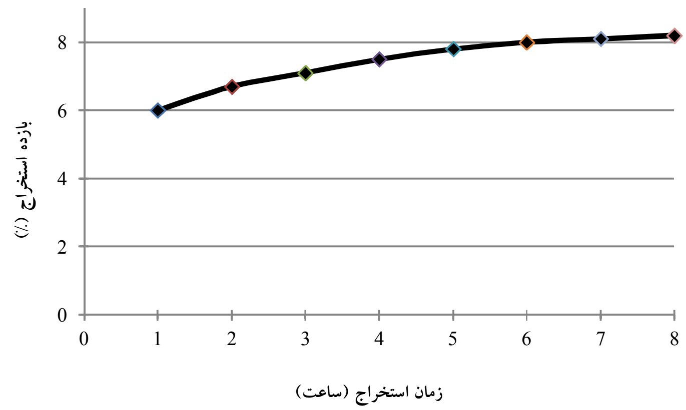
زمان استخراج

تأثیر زمان‌های مختلف استخراج (۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ ساعت) بر بازده عصاره خام استخراج شده از برگ گیاه پنیرک در شکل ۱ آمده است. برای بررسی تأثیر زمان استخراج، دو متغیر دمای استخراج و نسبت حلال به ماده خشک در نقطه مرکزی (میانگین سطوح پایین و بالا) ثابت نگه‌داشته شدند. به‌عبارت دیگر، سایر عوامل دمای استخراج و نسبت حلال به ماده‌خشک به ترتیب ۷۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۳میلی‌لیتر بر گرم در نظر گرفته شدند. همان‌طور که در شکل ۱ دیده می‌شود، با افزایش زمان از ۱ تا ۸ ساعت، بازده استخراج عصاره خام افزایش یافت و با افزایش زمان استخراج از ۱ تا ۸ ساعت، بازده استخراج از ۵/۹ تا ۸/۱ درصد افزایش یافت؛ هرچند افزایش بیشتر زمان استخراج به‌بیش از ۶ ساعت، در افزایش بازده استخراج عصاره خام تأثیر معنی‌داری نداشت. نتایج مشابهی نیز توسط Sun و همکاران (۲۰۱۰) و Liu و همکاران (۲۰۰۶) گزارش شده است. Chen و همکاران (۲۰۱۲) بیان داشتند که تأثیر زمان استخراج بر بازده استخراج عصاره از بافت‌های گیاهی به زمان لازم برای تورم بافت گیاهی، انحلال در حلال و انتشار آن به بیرون از سلول گیاهی وابسته است.

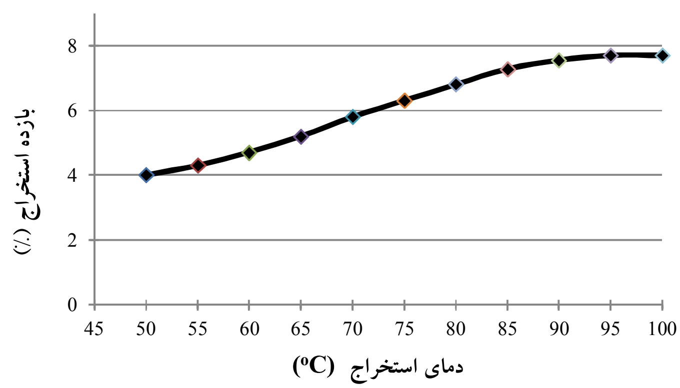
دمای استخراج

جهت بررسی تأثیر دماهای مختلف بر بازده استخراج عصاره خام از گیاه، فرآیند استخراج در دماهای مختلف (۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد) انجام شد (شکل ۲). زمان استخراج و نسبت حلال به ماده خشک به ترتیب ۳/۵ ساعت و ۱۳میلی‌لیتر بر گرم در نظر گرفته شد. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، با افزایش دمای استخراج، بازده استخراج عصاره خام افزایش یافت. این افزایش تا دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد ادامه یافت و بعد از آن با افزایش دما، بازده استخراج افزایش معنی‌داری نداشت. با توجه به شکل ۲، بیشترین بازده استخراج در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد بدست آمد. نتایج مشابهی نیز توسط محققین مختلف گزارش شده است (Ye و Jiang، ۲۰۱۱). افزایش ضریب انتشار در دماهای بالاتر باعث افزایش نرخ و میزان خروج ترکیباتی نظیر هیدروکلوئید از برگ گیاه و در

نتیجه بازده استخراج بالاتر می‌شود (Liu و همکاران، ۲۰۰۶). همچنین گزارش شده است که افزایش بازده استخراج از بافت‌های گیاهی در اثر افزایش دما، به سبب افزایش حلالیت آن در حلال می‌باشد (Liu و همکاران، ۲۰۰۶).



شکل ۱- تأثیر زمان استخراج بر بازده استخراج عصاره خام

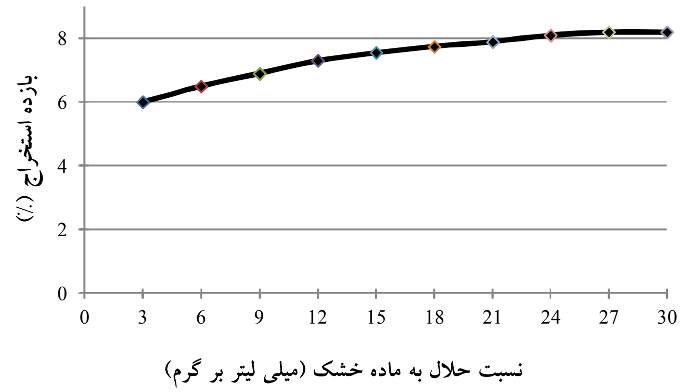


شکل ۲- تأثیر دمای فرآیند بر بازده استخراج عصاره خام

نسبت حلال به ماده‌خشک

نسبت آب به مواد جامد در فرآیند استخراج می‌تواند بازده فرآیند را به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر قرار دهد (Govender و همکاران، ۲۰۰۵). اگر این نسبت خیلی کم باشد ماده مورد نظر به‌طور کامل استخراج نشده و در نتیجه بازده استخراج کاهش می‌یابد، و اگر این نسبت خیلی زیاد باشد، باعث افزایش هزینه فرآیند و مشکلات پساب می‌شود (Yin و Dang، ۲۰۰۸). تأثیر نسبت‌های مختلف حلال به ماده‌خشک (۳، ۶، ۹، ۱۲، ۱۵، ۱۸، ۲۱، ۲۴، ۲۷ و ۳۰ میلی‌لیتر بر گرم) در شکل ۳ نشان داده شده است. این بررسی در شرایط زمان استخراج ۳/۵ ساعت و دمای استخراج ۷۵ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. همان‌طور که در شکل ۳ دیده می‌شود، با افزایش نسبت آب به برگ خشک شده گیاه از ۳ تا ۲۴، بازده استخراج عصاره خام از ۶/۱ تا ۸/۱ درصد افزایش یافت. با این‌حال، با افزایش بیشتر نسبت آب به برگ گیاه، بازده استخراج افزایش چندانی نیافت. Volpi (۲۰۰۴) بیان داشت که افزایش بازده استخراج در اثر افزایش نسبت آب به مواد جامد می‌تواند به‌دلیل سهولت انتشار آب به‌عنوان حلال به داخل سلول و خروج آسانتر ماده استخراجی در اثر کاهش ویسکوزیته محیط باشد.

بعد از مشخص شدن محدوده متغیرهای مورد بررسی و وارد کردن آن‌ها به نرم‌افزار دیزاین اکسپرت نسخه ۸، نقشه آزمایش‌ها بدست آمد. طرح کلی آزمایش‌ها شامل ۲۰ آزمون (Run) بود که با ۵ تکرار در نقاط مرکزی انجام گرفت (جدول ۲). سپس تک تک آزمایش‌های پیشنهادی در نقشه آزمایش انجام گرفت و میانگین نتایج آزمون‌ها به‌عنوان پاسخ در نظر گرفته شد و سپس تحلیل گردید تا در مرحله بعد این نتایج برای بدست آوردن شرایط بهینه، تجزیه و تحلیل گردند.



شکل ۳- تأثیر نسبت حلال به ماده خشک بر بازده استخراج عصاره خام

جدول۲- اثرات متقابل سه‌گانه متغیرها بر بازده استخراج عصاره خام (٪) از برگ گیاه پنیرک

آزمون	زمان استخراج (h)	دمای استخراج (C)	نسبت حلال به ماده خشک (ml/g)	مقدار واقعی	مقدار پیش بینی شده	مقدار باقی مانده
۱	۶	۷۵	۳	۶/۶	۶/۵۶۶۶	۰/۰۳۳۳۳
۲	۱	۷۵	۲۱	۸/۴	۸/۵۶۶۶	-۰/۱۶۶۶
۳	۳/۵	۷۵	۱۲	۷/۳	۷	۰/۳
٤	۱	۹۵	۲۱	۶/۲	۶/۱	۰/۱
۵	۳/۵	۵۵	۲۱	۶/۵	۶/۴۶۶۶	۰/۳۳۳۳
٦	۳/۵	۷۵	۲۱	۷/۶	۷/۵۶۶۶	۰/۰۳۳۳۳
۷	۳/۵	۹۵	۱۲	۸/۳	۸	۰/۳
۸	۱	۷۵	۱۲	۸/۴	۸/۵۶۶۶	-۰/۱۶۶۶
۹	۶	۷۵	۲۱	۶/۲	۶/۴۳	۰/۱۶۶۶
۱۰	۳/۵	۹۵	۳	۹/۲	۹/۱	۰/۱
۱۱	۱	۷۵	۱۲	۷/۸	۷/۸۳۳۳	-۰/۰۳۳۳۳
۱۲	۶	۵۵	۱۲	۷/۴	۷/۵۶۶۶	-۰/۱۶۶۶
۱۳	۱	۵۵	۳	۵/۶	۵/۵۶۶۶	۰/۰۳۳۳۳
۱٤	۶	۹۵	۳	۷/۸	۷/۸۳۳۳	-۰/۰۳۳۳۳
۱۵	۳/۵	۹۵	۱۲	۹	۹/۹۳۳۳	۰/۰۶۶۶
۱٦	۳/۵	۵۵	۲۱	۶/۸	۶/۷۶۶۶	۰/۰۳۳۳
۱۷	۱	۷۵	۳	۷/۲	۷/۲۶۶۶	-۰/۰۶۶۶
۱۸	۶	۷۵	۱۲	۹/۲	۹/۹۱۶۶	۰/۲۸۳۳
۱۹	۳/۵	۷۵	۳	۸/۶	۸/۵۶۶۶	۰/۰۳۳۳۳
۲۰	۱	۵۵	۳	۶/۴	۶/۵۶۶۶	-۰/۱۶۶۶

تجزیه آماری و بررسی کارآمدی مدل

تجزیه واریانس برای ارزیابی اثرات معنی‌داری متغیرهای فرآیند روی هر یک از پاسخ‌ها انجام شد. با انجام تجزیه رگرسیون چند متغیره، مدل‌های چند جمله‌ای درجه دوم برای پیش‌بینی هر یک از پاسخ‌ها به‌دست آمد. برازش داده‌های به‌دست آمده برای درصد بازده استخراج و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره خام استخراجی بدست آمده، براساس مدل چند جمله‌ای درجه‌دو صورت گرفت. به‌منظور تعیین اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها، از نرم افزار دیزاین اکسپرت نسخه ۸ استفاده شد. نتایج جداول تجزیه واریانس در مورد بازده استخراج عصاره خام در جدول ۳ مشاهده می‌شود.

جدول۳- تجزیه واریانس اثرات متقابل سه‌گانه متغیرها بر بازده استخراج عصاره خام از برگ گیاه پنیرک

منبع تغییرات	Some of Squares (SS)	DF	Mean Square (MS)	F Value	F<Probp-value	
Model	۲۷۱/۷۶۱۷	۱۴	۱۹/۴۱۱۵۵	۳۸۸/۴۱۶	۰/۰۰۰۱>	significant
زمان استخراج (A)	۲۷/۹۰۷۵	۱	۲۷/۹۰۷۵	۵۵۸/۴۱۵۹	۰/۰۰۰۱>	
دمای استخراج (B)	۱۲۶/۱۰۰۸	۱	۱۲۶/۱۰۰۸	۲۵۲۳/۲۱۸	۰/۰۰۰۱>	
نسبت حلال به ماده خشک (C)	۸۹/۱۰۷۵	۱	۹۸/۱۰۷۵	۱۷۸۲/۹۹	۰/۰۰۰۱>	
AB	۱/۱۰۲۵	۱	۱/۱۰۲۵	۲۲/۰۶۰۵۱	۰/۰۰۰۳	
AC	۱/۹۶	۱	۱/۹۶	۳۹/۲۱۸۶۸	۰/۰۰۰۱>	
BC	۱/۸۲۲۵	۱	۱/۸۲۲۵	۳۶/۴۶۷۳۷	<۰/۰۰۰۱	
A^2	۰/۲۷۷۰۴۵	۱	۰/۲۷۷۰۴۵	۵/۵۴۳۵۴۱	۰/۰۳۳۷	
B^2	۰/۳۰۹۲۰۷	۱	۰/۳۰۹۲۰۷	۶/۱۸۷۰۹	۰/۰۲۶۱	
C^2	۰/۱۵۹۲۰۷	۱	۰/۱۵۹۲۰۷	۳/۱۸۵۶۶۱	۰/۰۹۶۰	ns
Residual	۰/۰۴۹۹۷۶	۱	۰/۰۲۲			
Lack of Fit	۰/۰۵۵۱۶۷	۱۰	۰/۰۲۵	۱/۴۹۰۹۹۱	۰/۳۷۳۰	ns
Pure Error	۰/۰۳۷	۴	۰/۰۱۹			
Cor Total		۲۴				

ns: در کلیه سطوح معنی‌دار نیست.

با توجه به جدول۳، تجزیه واریانس اثرات خطی زمان استخراج، دمای استخراج و نسبت حلال به ماده خشک و همچنین اثرات متقابل زمان و دمای استخراج، زمان استخراج و نسبت حلال به ماده خشک، دمای استخراج ونسبت حلال به ماده خشک بر بازده استخراج عصاره خام از برگ گیاه پنیرک معنی‌دار بودند ($p<۰/۰۱$). به‌علاوه، اثرات درجه دوم زمان و دمای استخراج در سطح اطمینان ۹۵٪ معنی‌دار بودند. همچنین فاکتور اثر درجه دوم نسبت حلال به ماده خشک و فاکتور عدم برازش در سطح اطمینان ۹۵٪ معنی‌دار نبود. براساس نتایج تجزیه داده‌ها (جدول ۳)، در بین متغیرهای مورد بررسی، دمای استخراج بیشترین تأثیر و زمان استخراج کمترین تأثیر را بر بازده استخراج داشت. علت این موضوع را می‌توان به خروج بخش عمده ترکیبات عصاره در همان مراحل ابتدایی استخراج نسبت داد. خروج ترکیبات عصاره خام از بافت گیاه بر اساس مکانیسم انتشار صورت می‌پذیرد و این انتشار وابسته به زمان است. به‌عبارت دیگر، در ابتدای استخراج خروج ترکیبات با شدت بیشتری رخ می‌دهد و به دلیل گرادیان غلظت بیشتر، نرخ انتقال جرم نیز بیشتر بوده اما رفته رفته با گذشت زمان کاهش می‌یابد.

همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، آزمون ضعف برازش مربوط به مدل چند جمله‌ای درجه دوم برازش یافته بر داده‌های پاسخ در سطح اطمینان ۹۵٪ معنی‌دار نمی‌باشد. همچنین با توجه به نتایج جدول ۴ و بالا بودن مقادیر R^2 و R^2 تعدیل شده و دقت بالای مدل (Adequate Precision) و از طرف دیگر پایین بودن ضریب تغییرات (C.V.) می‌توان نتیجه گرفت که مدل می‌تواند بخوبی جهت تخمین نتایج آزمایش به‌کار برده شود.

جدول ٤- پارامترهای آماری حاصل از برازش مدل درجه‌دوم بر داده‌های تجربی

Std. Dev.	۰/۰۷۵	R-Squared	۰/۹۸۹۷
Mean	۷/۶۴	Adj R-Squared	۰/۹۷۹۴
C.V. %	۰/۶۴	Pred R-Squared	۰/۹۹۸۴
PRESS	۰/۴۲	Adeq Precision	۲۱/۶۱

مدل‌سازی بازده استخراج عصاره خام

بهینه‌یابی سطح پاسخ نسبت به روش سنتی بهینه‌یابی تک پارامتر، بخاطر ذخیره زمان، فضا و مواد خام کارآمدتر است. با به‌کارگیری تجزیه رگرسیون چندگانه در داده‌های آزمایشی، متغیر پاسخ و متغیرهای مورد بررسی با معادله ۶ به‌هم مرتبط می‌شوند:

$$Y = ۷/۸۲ + ۱/۰۲۵ X_۱ + ۳/۲۴۱۶۶۷ X_۲ + ۲/۰۳۱ X_۳ + ۰/۵۲۵ X_۱X_2 - ۰/۷ X_۱X_۳ + ۰/۶۷۵ X_۲X_۳ - ۰/۲۰۶ X_۱^۲ - ۰/۲۱۸۳۳ X_۲^۲ \quad (۶)$$

در این رابطه:

Y: درصد بازده استخراج، $X_۱$: زمان استخراج، $X_۲$: دمای استخراج، $X_۳$: نسبت حلال به ماده خشک

بهینه‌سازی فرآیند استخراج عصاره خام

شرایط عملیاتی بهینه برای استخراج عصاره خام از برگ گیاه پنیرک با استفاده از تکنیک بهینه‌سازی عددی به روش سطح پاسخ توسط نرم افزار دیزاین اکسپرت نسخه ۸ بررسی گردید. بدین منظور در ابتدا شرایط بهینه جهت حصول به حداکثر میزان بازده استخراج عصاره خام توسط نرم‌افزار انتخاب گردید. شرایط بهینه پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار شامل زمان استخراج ۶ ساعت، دمای استخراج ۹۵ درجه‌سانتی‌گراد و نسبت آب به ماده خشک ۱۹ میلی‌لیتر بر گرم بود (شکل ۷). سپس برای بررسی درستی و صحت نتایج حاصل از مدل و نرم افزار، در شرایط آزمایشگاه در نقاط بهینه ارائه شده توسط نرم‌افزار، آزمایشی در ۳ تکرار انجام شد (جدول ۵). طبق جدول ۵ راندمان تجربی ۹/۲۲ و راندمان پیش‌بینی شده ۹/۱۸ تعیین گردید. همان‌طور که مشاهده می‌شود اختلاف معنی‌داری بین نتیجه پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار و نتیجه به‌دست آمده از آزمون تجربی در آزمایشگاه مشاهده نشد. مقادیر مختلفی به‌عنوان حداکثر میزان بازده استخراج از برگ گیاه پنیرک گونه *Malva sylvestris* ۸/۳۷٪ (Samavati و Manoochehrizade، ۲۰۱۳a)، برگ گیاه ناترک (*Dodonaea viscosa var. angustifolia*) ۹/۴۵٪ (Samavati و Manoochehrizade، ۲۰۱۳ b)، قارچ *Tricholoma mongolicum*، ۲۴/۱ ٪ (Wang و همکاران، ۲۰۱۵)، و برگ تمشک‌فرنگی (*Rubus chingii Hu*)، ۸/۷۱ ٪ (Zhang و همکاران، ۲۰۱۵) گزارش شده است.

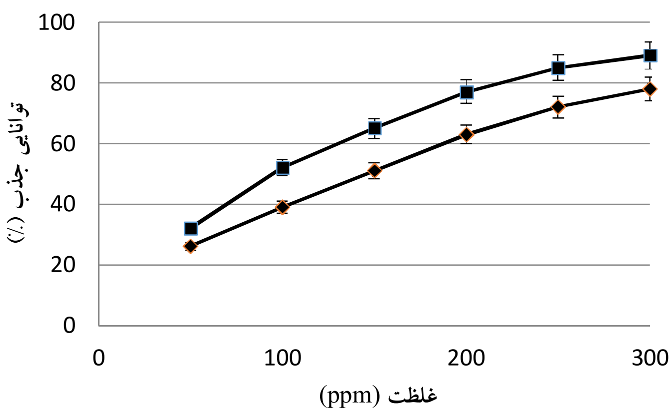
جدول ۵- بازده استخراج بدست آمده توسط نرم‌افزار و آزمون تجربی در شرایط بهینه

شرایط بهینه			راندمان استخراج	
زمان استخراج (ساعت)	دمای استخراج (درجه سانتی‌گراد)	نسبت حلال به ماده خشک (میلی‌لیتر/گرم)	تجربی	پیش‌بینی شده
۶	۹۰	۱۹	۹/۲۲±۰/۴۷	۹/۱۸

ویژگی ضداکسندگی عصاره خام استخراج شده

توانایی جذب رادیکال‌های DPPH

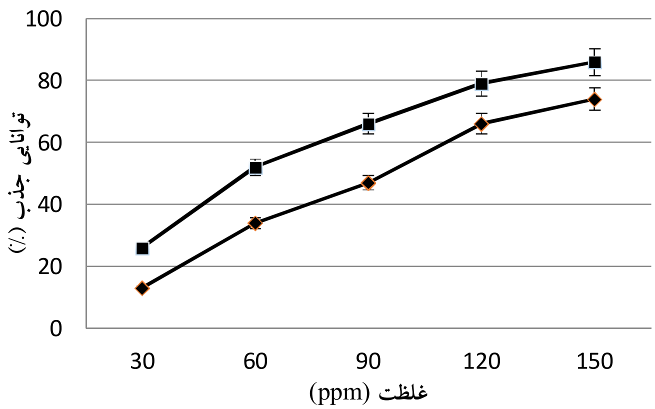
ویژگی و توانایی جذب رادیکال‌های DPPH به‌عنوان تابعی از غلظت عصاره خام استخراج شده (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ppm ۳۰۰) در شکل ۴ نشان داده شده است. از ویژگی ماده ضداکسنده مصنوعی BHT در جذب رادیکال‌های DPPH به‌عنوان شاهد استفاده گردید. همانطور که در شکل ۴ دیده می‌شود، با افزایش غلظت عصاره خام استخراج شده، توانایی جذب رادیکال‌های DPPH افزایش می‌یابد. از طرف دیگر، توانایی عصاره استخراج شده از برگ گیاه در جذب رادیکال‌های DPPH بیش از ماده ضداکسنده مصنوعی و شناخته شده BHT می‌باشد. در غلظت ppm ۳۰۰، عصاره خام استخراج شده دارای توانایی جذب ۸۹٪ می‌باشد درحالی‌که ماده ضداکسنده مصنوعی BHT دارای توانایی جذب ۷۸٪ می‌باشد. در تحقیقی مشابه که روی عصاره استخراج شده از برگ گیاه پنیرک گونه sylvestris انجام گرفت مشخص گردید که عصاره استخراجی در غلظت ۳۰۰ پی‌پی‌ام حدود ۸۵٪ توانایی جذب رادیکال DPPH را دارد (Samavati و Manoochehrizade، ۲۰۱۳a). باتوجه به نتایج بدست آمده، عصاره خام استخراج شده را می‌توان به‌عنوان یک ماده مناسب برای جذب رادیکال‌های DPPH و احتمالا ضدسرطان معرفی کرد.



شکل ٤- توانایی جذب رادیکال‌های DPPH (عصاره خام استخراج شده: ■، BHT: ◆)

توانایی جذب رادیکال‌های هیدروکسیل (OH)

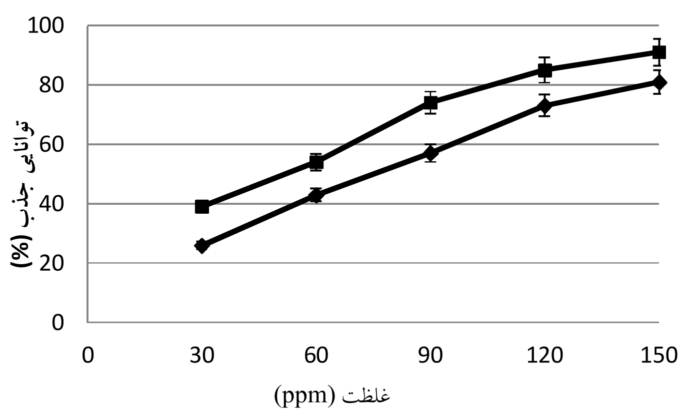
رادیکال‌های هیدروکسیل مهمترین نوع رادیکال‌های آزاد در سیستم‌های زیستی هستند که می‌توانند به تمام انواع سلول‌ها حمله کرده و باعث ایجاد واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون توسط رادیکال‌های آزاد شوند (Barry و Susanna، ۱۹۹۳). توانایی جذب رادیکال‌های هیدروکسیل در غلظت‌های مختلف عصاره خام استخراج شده از برگ گیاه پنیرک (ppm ۱۵۰-۳۰) در شکل ۵ نشان داده شده است. از نمونه حاوی اسید آسکوربیک بدون عصاره خام استخراج شده به‌عنوان نمونه شاهد استفاده گردید. نتایج نشان داد که خاصیت جذب‌کنندگی رادیکال‌های هیدروکسیل توسط عصاره خام استخراج شده از برگ گیاه، وابسته به غلظت بوده، به‌طوری که با افزایش غلظت عصاره خام استخراج شده از ۳۰ به ppm ۱۵۰، توانایی جذب رادیکال‌های هیدروکسیل از ۳۳ به ۸۷٪ (معادل ۱۶۳٪) افزایش می‌یافت. به‌علاوه مشخص گردید که در غلظت برابر با اسید آسکوربیک (۱۵۰ پی‌پی‌ام) ، عصاره خام استخراج‌شده از برگ گیاه پنیرک از توانایی بالاتری در جذب رادیکال‌های هیدروکسیل برخوردار می‌باشد (۸۷٪ در برابر ۷۴٪). در تحقیقی که توسط Wang و همکاران (۲۰۱۵) انجام گرفت، بیان شد که عصاره استخراج شده از قارچ خوراکی *Tricholoma mongolicum* Imai در غلظت ۳۰۰ پی‌پی‌ام دارای حدود ۷۹٪ توانایی جذب رادیکال آزاد هیدروکسیل می‌باشد.



شکل ۵- توانایی جذب رادیکال‌های هیدروکسیل (OH) (عصاره خام استخراج شده:■، اسید آسکوربیک:◆)

توانایی جذب رادیکال‌های سوپراکسید

نتایج نشان داد که عصاره خام استخراجی از برگ گیاه پنیرک پتانسیل جذب رادیکال آنیونی سوپراکسید خوبی را از خود نشان می‌دهد. همانطور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت عصاره خام استخراجی از ۳۰ تا ppm ۱۵۰ خاصیت جذب آنیون سوپراکسید (O_2^-) از ۳۹ به ۹۱٪ افزایش می‌یابد.



شکل ٦- توانایی جذب رادیکال‌های سوپراکسید (عصاره خام استخراج شده:■، اسید آسکوربیک:◆)

همچنین توانایی عصاره خام استخراجی در جذب رادیکال سوپراکسید از نمونه شاهد یعنی اسید آسکوربیک نیز در تمامی غلظت‌ها بیشتر می‌باشد. با توجه به شکل ۶، توانایی اسید آسکوربیک در جذب رادیکال سوپراکسید با افزایش غلظت ۳۰ تا ۱۵۰ ppm، از مقدار۳۰ به ۸۱٪ افزایش می‌یابد. در نتیجه عصاره خام استخراجی می‌تواند به‌عنوان منبع مناسبی جهت جذب رادیکال‌های سوپراکسید معرفی شود. همانند نتایج به‌دست آمده در این تحقیق، Güder و Korkmaz (۲۰۱۲) در پژوهشی در مورد ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی قسمت‌های مختلف گیاه *M. neglecta Wallr* قابلیت جذب بالایی از رادیکال سوپراکسید را در مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی (BHA و BHT) و طبیعی (آلفا توکوفرول) گزارش نمودند. این محققین مقدار جذب رادیکال سوپراکسید در محلول حاوی غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره استخراج شده از گل و برگ گیاه و همچنین آنتی‌اکسیدان‌های BHA، BHT، و آلفا توکوفرول را به ترتیب ۸۴/۲٪، ۷۵/۴٪، ۶۷/۸٪، ۵۶/۴٪ و ۴۴٪ گزارش نمودند

نتیجه گیری

استخراج عصاره خام از برگ گیاه پنیرک گونه *Malva neglecta* به‌طور موفقیت آمیزی انجام گرفت و نتایج نشان داد که عواملی مانند زمان استخراج، دمای استخراج و نسبت حلال به ماده خشک در بازده استخراج تأثیر معنی‌داری دارند. همچنین نتایج حاصل از آزمایشات شیمیایی نشان داد که عصاره خام استخراجی دارای توانایی و ظرفیت زیادی در جذب رادیکال‌های آزاد DPPH، هیدروکسیل (OH) و سوپراکسید می‌باشد که احتمالاً این خاصیت به وجود اسیدهای فنولیک (به دو شکل آزاد یا متصل شده به پلی‌ساکاریدها) و پلی-ساکاریدهای سولفاته آن مربوط است. نتایج این تحقیق نشان داد که باتوجه به بالاتر بودن توانایی جذب رادیکال‌های آزاد توسط عصاره خام استخراجی از گیاه پنیرک گونه *Malva neglecta* نسبت به آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی اسید آسکوربیک و مصنوعیBHT، گیاه مذکور می‌تواند به‌عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدان و ضدسرطان پیشنهاد شود و کشت این گیاه به عنوان یک گیاه دارویی با ارزش مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از طرح پژوهشی به شماره ۹۱۲/۴۲ است و نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان به دلیل حمایتهای مالی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

صالحی سورمقی، م.ح. ۱۳۸۷. گیاهان دارویی و گیاه درمانی، جلد اول، انتشارات دنیای تغذیه، تهران.

طاهری، ا. م.ع. ۱۳۸۳. بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی برخی از بافت‌های گیاهی. سنبله (ماهنامه علمی، فنی، کشاورزی، زیست محیطی)، شماره ۱۳۴، ۱۷-۱۴.

Azimova, S.S. & Glushenkova A.I. (Eds.), 2012, Lipids, Lipophilic Components and Essential Oils from Plant Sources. Springer, Tashkent, *Republic of Uzbekistan*, 609-633.

Balasundram, N., Sundram K., & Samman S., 2006, Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191–203.

Barry, H. & Susanna, C., 1993, Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57, 715–725.

Baytop, T., 1984, Therapy with Plants in Turkey. İstanbul University Publ., İstanbul, 226-227.

Britigan, B. E., Pou, S., Rosen, G. M., Lilleg, D. M., & Buettner, G. R., 1990, Hydroxyl radical is not a product of the reaction of xanthine oxidase and xanthine. *Journal of Biological Chemistry*, 263, 17533–17538.

Chen, Y., Gu, X., Huang, S., Li, J., Wange, X. & Tang, J., 2010, Optimization of ultrasonic/microwave assisted extraction (UMAE) of polysaccharides from Inonotus obliquus and evaluation of its anti-tumor activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46, 429–435.

Chen, Y., Zhang, J., Li, C., Chen, Z. & Jia, L., 2012, Extraction and in vitro antioxidant activity of mopan persimmon polysaccharide. *Journal of Applied Polymer Science*, 124, 1751–1756.

Costa, L.S., Fidelis, G.P., Cordeiro, S.L., Oliveira, R.M., Sabry, D.A., Câmara, R.B.G., et al., 2010, Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomed Pharmacother*, 64(1), 21-28.

Ebrahimzadeh, M. A., Pourmorad, F. & Hafezi, S., 2008, Antioxidant activities of Iranian corn silk. *Turkish Journal of Biology*, 32, 43-9.

Espin, J. C., Soler-Rivas, C. & Wichers, H. J., 2000, Characterisation of the total free radical scavenger capacity of vegetabale oils and oil fractions using 2, 2-diphenyl- 1- picrylhydrazyl radical. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 648 -656.

Fennema, O. R., 1996, Food Chemistry. New York: Marcel Dekkert, U.S.A.

Govender, S., Pillay, V., Chetty, D. J., Essack, S. Y., Dangor, C. M. & Govender, T., 2005, Optimization and

characterization of bioadhesive controlled release tetracycline microspheres. *International Pharmacy Journal*, 306, 24–40.

Güder, A. & Korkmaz, H., 2012, Evaluation of in-vitro antioxidant properties of hydroalcoholic solution extracts Urtica dioica L., Malva neglecta Wallr. And their mixtures. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 11 (3), 913-923.

Jiang, B., Zhang, H., Liu, C., Wang, Y. & Fan, S., 2010, Extraction of water-soluble polysaccharide and the antioxidant activity from Ginkgo biloba leaves. *Medicinal Chemistry Research*, 19, 262–270.

Khodaei, N., Karboune S. & Orsat, V., 2016, Microwave-assisted alkaline extraction of galactan-rich rhamnogalacturonan I from potato cell wall by-product. *Food Chemistry*, 190, 495–505.

Liang, R. J., 2008, Optimization of extraction process of glycyrrhiza glabra polysaccharides by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 74, 858–861.

Liu, J., Sun, Y., Liu, L. & Yu, C., 2011, the extraction process optimization and physicochemical properties of polysaccharides from the roots of Euphorbia fischeriana. International Journal of Biological *Macromolecules*, 49, 416–421.

Liu, Z. D., Wei, G. H., Guo, Y. C. & Kennedy, J. F., 2006, Image study of pectin extraction from orange skin assisted by microwave. *Carbohydrate Polymers*, 64, 548–552.

Mavi, A., Terzi, Z., Özgen, U., Yildirim, A. & Coşkun, M., 2004, Antioxidant properties of some medicinal plants: Prangos ferulacea (Apiaceae), Sedum sempervivoides (*Crassulaceae*), Malva neglecta (*Malvaceae*), Cruciata taurica (*Rubiaceae*), Rosa pimpinellifolia (*Rosaceae*), Galium verum subsp. verum (*Rubiaceae*), Urtica dioica (*Urticaceae*). *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(5), 702-705.

Myers, R. H. & Montgomery, R. C., 2002, Response Surface Methodology, Process and Product Optimization using Design Experiment, Wiley, New York.

Pacher, P., Beckman, J. S. & Liaudet, L., 2007, Nitric Oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiology* Review, 87(1), 315–424.

Qi, H., Liu, X., Ma, J., Zhang, Q. & Li, Z., 2010, in vitro antioxidant activity of acetylated derivatives of polysaccharide extracted from Ulva pertusa (Chlorophyta). *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(23), 2445-2451.

Samavati, V. & Manoochehrizade, A., 2013a, Polysaccharide extraction from Malva sylvestris and its anti-oxidant activity. *International Journal of Biological Macromolecules* 60, 427– 436.

Samavati, V. & Manoochehrizade, A., 2013b, Dodonaea viscosa var. angustifolia leaf: New source of polysaccharide and its anti-oxidant activity. *Carbohydrate Polymers*, 98, 199– 207.

Singh, A., 2010, Optimization of microwave-assisted extraction of antioxidants from potato peels. MSc thesiss, McGill University, Ste Anne De Bellevue, Quebec, Canada.

Sun, Y., Liu, J. & Kennedy, J. F., 2010, Application of response surface methodology for optimization of polysaccharides production parameters from the roots of Codonopsis pilosula by a central composite design. *Carbohydrate Polymers*, 80, 949–953.

Tiana, Y., Zenga, H., Xuc, Z., Zhenga, B., Lind, Y., Gand, C. & Martin Lo, Y., 2012, Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharides recovered from white button mushroom (Agaricus bisporus). *Carbohydrate Polymers*, 88 522– 529.

Volpi, N., 2004, Disaccharide mapping of chondroitin sulfate of different origins by high performance capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *Carbohydrate polymers*, 55(3),

Wang, J., Wang, F., Zhang, Q. B., Zhang, Z. S., Shi, X. L. & Li, P. C., 2009, Synthesized different derivatives of low molecular fucoidan extracted from Laminaria japonica and their potential antioxidant activity in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, 44, 379–384.

Wang, J., Zhao, Y., Li, W., Wang, Z. & Shen, L., 2015, Optimization of polysaccharides extraction from Tricholoma mongolicum Imai and their antioxidant and anti-proliferative activities. *Carbohydrate Polymers*, 131, 322-330.

White, R. C., Brock, T. A., Chang, L. Y., Crapo, L. Y., Briscoe, P., Ku, D., et al., 1994, Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 91, 1044–1048.

Xie, J. H., Xie, M. Y., Nie, S. P., Shen, M. Y., Wang, Y. X. & Li, C., 2010, Isolation chemical composition and antioxidant activities of a water-soluble polysaccharide from Cyclocarya paliurus (Batal.) Iljinskaja. *Food Chemistry*, 119, 1626–1632.

Ye, C. L. & Jiang, C. J., 2011, Optimization of extraction process of crude polysaccharides from Plantago asiatica L. by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 84, 495–502.

Yin, G. & Dang, Y., 2008, Optimization of extraction technology of the Lycium barbarum polysaccharides by Box–Behnken statistical design. *Carbohydrate Polymers*, 74, 603–610.

Zha, X. Q., Wang, J. H., Yang, X. F., Liang, H., Zhao, L. L., Bao, S. H., et al., 2009, Antioxidantproperties of polysaccharide fractions with different molecular massextracted with hot-water from rice bran. *Carbohydrate Polymers*, 78, 570–575.

Zhang, T. T., Lu, C. L. Jiang, J. G., Wang, M., Wang, D. M. & Zhu. W., 2015, Bioactivities and extraction optimization of crude polysaccharides from the fruits and leaves of Rubus chingii Hu. *Carbohydrate Polymers*, 130, 307-315.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 13, No. 1, Apr. May. 2017, p. 167- 179

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۳، شماره ۱، فروردین-اردیبهشت ۱۳۹۶ ص.۱۷۹-۱۶۷

Extraction of crude extract from *Malva neglecta* leaves and evaluation of its free radical scavenging activities

H. Jooyandeh[1*], V. Samavati[2]

Received: 2015.06.15
Accepted: 2015.11.14

Introduction: Accumulation of free radicals could lead to permanent oxidative destruction of organisms by attacking macromolecules and organelles of the body, thus causing organism aging, fatigue and degenerative diseases. Therefore, discovering and developing safe and non-toxic natural antioxidants has been an interesting topic in recent decades. Compared to synthetic antioxidants, extracts from plant resources usually have quite stable constructions and great antioxidant activities, and can easily be absorbed without dangerous immunoreactions. Many antioxidant compounds, naturally occurring from plant sources, have been identified as free radicals or active oxygen scavengers. *Malva neglecta* (MN), which is known as Panirak/Tooleh in Iran is an annual and herbaceous plant. The leaves and flowers of MN are used in traditional phytotheraphy and in treatment of cough, respiratory system and digestive system problems. The objective of this study was to optimize process conditions of extraction in order to obtain the highest yield from crude extract of MN leaves and identify its antioxidant properties.

Materials and methods: Three-variable-three-level Box-Behnken design-response surface methodology (BBD-RSM) with five replications at central point was used to optimize the extracting parameters of crude extract from the MN leaves including extraction time (1-8 h), extraction temperature (50-100°C), and the water/solid ratio (3-30). The ability of extracted materials to scavenge the free radicals of DPPH, OH and super oxide was also evaluated by chemical analysis.

Results and Discussion: All three independent variables effected the yield of crude extract of MN leaves. The extraction yield of MN crude extract significantly increased from 5.90% to 8.01% with extraction time varying from 1 h to 6 h. However, the yield was not altered meaningfully, as the extraction time was increased from 6 h up to 8 h. This may be due to degradation of the polysaccharides because of the extended extraction time. The extraction process was performed with temperatures from 50 °C to 100 °C, with the other extraction variables such as ratio of water to raw material and extraction time fixed at 13 ml/g and 3.5 h, respectively. The extraction yield of crude extract increased with increasing extraction temperature and peaked at 7.89 at 100 °C.

Different ratios of water to raw material have considerable effect on extraction yield. In this study, we used ratios of water to raw material from 3 to 30 ml/g, with fixed parameters (extraction time and extraction temperature at 3.5 h and 75 °C, respectively). Extraction yield increased noticeably from 6.10 to 8.10 with ratio of water to material varying from 3 ml/g to 24 ml/g. As extraction time, at the higher experimental levels, as the ratio of water to raw material was increased (from 24 up to 30 ml/g) the yield of crude extract was not changed considerably. Under the appropriate condition of ratio of water to raw material, the crude extract molecules can swell thoroughly, and more compounds could dissolve in water to improve extraction yield.

The determination coefficient (R2 = 0.9897) suggested that the model was valid, implying that 98.97% of the variation could be explained by the fitted model. The adjusted determination coefficient was used to evaluate the correlation between the experimental values and predicted values, and the outcome (R^2_{Adj}= 0.9794) suggested that the correlation was significant. The f-value (1.49) for "the lack of fit" indicated that the "lack of fit" was not significant relative to the pure error ($p > 0.05$). The CV for yield of MN leaves was 0.64%, which defined a good reliability of the experimental values. The adequate precision value 21.61 and PRESS 0.42 for our model indicated an appropriate model could be designed. On multiple regression analysis, the quadratic polynomial equation for the independent variables and response variable expressed as follows:

$$Y = 7.82 + 1.025X_1 + 3.241667X_2 + 2.031X_3 + 0.525X_1X_2 - 0.7X_1X_3 + 0.675X_2X_3 - 0.206X_1^2 - 0.21833X_2^2$$

1 And 2. Associate professor and Assistant professor, Department of Food Science & Technology, Ramin Agriculture & Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Ahvaz, Iran
(*-Corresponding Author E-mail address: hosjooy@yahoo.com)

Where, Y is extraction yield (%); X_1, extraction time (h); X_2, extraction temperature; and X_3, ratio of water to raw material (ml/g)

Statistical analysis of the results showed that the optimal conditions for higher extraction yield were extraction time: 6 h, extraction temperature: 90°C, and the ratio of water to raw material: 19. Under these conditions, the experimental yield was 9.22% ± 0.47%, which well matched the predicted value (9.18%), under these conditions; the experimental yield was 9.18%.

Furthermore, results obtained from chemical analysis showed that DPPH, OH and super oxide scavenging of MN crude extract increased rapidly with increasing of its concentration. DPPH scavenging rate of the crude extract was more than BHT standard (89% vs. 78%) at their maximum equivalent concentration (300 ppm). Furthermore, OH and super oxide scavenging ability of MN crude extract (87% and 91%, respectively) were significantly more than ascorbic acid standard solutions (74% and 81%, respectively) at their highest experimental concentrations (150 ppm). Based on our results, components extracted from *Malva neglecta* leaves may introduce as an antioxidant and free radical scavenger. This study could help food industries to add a new source of hydrocolloid with certain functionality as an alternative additive in different foods, cosmetic and pharmaceutical products.

Keywords: *Malva neglecta;* Extraction; Crude extract; Antioxidant property; Free radical.